

개 난자에 부고환 정자로 ICSI후 배양하였을 때 체외발생율에 관한 연구

김상근[†] · 이동수 · 이만희¹

충남대학교 수의과대학

Studies on the Developmental Rate of Oocytes Obtained by Intracytoplasmic Sperm Injection with Epididymal Spermatozoa in Domestic Dogs

Kim, S. K.[†], D. S. Lee and M. H. Rlee¹

College of Vet. Med., Chungnam National University

ABSTRACT

The objective of this study was to determine the developmental competence of *in vitro* matured oocytes after intracytoplasmic sperm injection(ICSI) with epididymal spermatozoa. The ovaries were obtained from slaughtered small species dogs. Oocytes matured *in vitro* for 24 hrs were fertilized by ICSI with epididymal spermatozoa. After ICSI, one group of oocytes was activated with 2.0 mM dimethylaminopurine or 7% ethanol for 5 min. and second group was not activated. The follicular oocytes were cultured in synthetic oviductal fluid(SOF) and TCM-199 medium containing hormones and 10% FCS for 24~48 hrs in a incubator with 5% CO₂ in air at 38.5°C.

1. Results of IVM showed that the percentage of oocytes reaching M II after 24 h and 48 hrs of incubation were significantly higher($p<0.05$) after culture with 48 hrs(9/30, 30.0%) than that after culture with 24hrs(8/30, 26.7%).
2. Results of IVM showed that the percentage of oocytes reaching M II after 48 hrs of incubation were significantly higher($p<0.05$) after culture with SOF media(10/30, 30.3%) than TCM-199 media (7/30, 23.3%).
3. The rate of cleaved embryos to blastocyst obtained by ICSI treated activation oocytes was significantly higher($p<0.05$) than that of nonactivation oocytes(5/16, 25.0% vs 1/13, 5.0%).
4. The rates of development of cleaved embryos to blastocyst obtained by ICSI treated sperm of fresh, epididymal and frozen-thawed epididymal were 8/18(44.43%), 5/16(31.3%), 2/14(14.3%), respectively. and these values of frozen-thawed epididymal sperm injection were lower than fresh sperm injection.

(Key words : Dogs, IVM, ICSI, Activation, Frozen-thawed epididymal sperm)

I. 서 론

최근 경제성장과 더불어 애완동물의 사육수가 증가됨에 따라 번식을 위한 종견의 수요가 많아져 고가인 고급견의 수입이 증대되고 있다. 특히, 최

[†] Corresponding author : College of Vet. Med., Chungnam National University, Taejon, 305-764, Korea, E-mail : kskkim@hanbat.cnu.ac.kr

¹ 워싱턴대학교 세포생리학과(Department of Cell Biology and Physiology, Washington University)

근에는 소형종이 주로 사육되고 있는데 이들은 좁은 공간에서 운동이 부족한 상태에서 고단백 또는 고지방식으로 사육되고 있어 번식장애와 나아가 많은 질병으로 이어지고 있다.

체격이 왜소한 소형견은 고단백, 고지방식으로 사육되면서도 운동량이 절대적으로 부족하여 정액량이 극히 적거나 정자수가 희소하여 불임개체가 많은 실정이다(Gunzel, 1986; Kim, 2001). 소형견 정액은 정액량과 정자수가 극히 적고 정액중의 정상성분은 정자에 유해한 효소를 가지고 있고 정장내에 유리되어 있는 원형질 소적은 많은 lysosomal enzyme를 포함하고 있어 완전한 동결방법이 개발되지 않아 동결정액의 실용화는 개선되어야 할 점이 많은 실정이다(Dott와 Dingle, 1968; Alison과 Hartree, 1970; Allen과 England, 1992).

난자의 세포질내 단일정자 주입(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)에 관한 연구는 주로 인간을 대상으로 불임치료 연구(Bar Hava 등, 1977; Barros 등, 1997; Holden 등, 1977; Hoover 등, 1997)에 주로 이용되었지만 애완동물 즉 개를 대상으로 연구한 보고는 접할 수 없었다. Bogliolo 등(2001)은 고양이 난자를 이용하여 활성화 처리후 24, 40시간 배양하였을 때 M II로의 체외성숙율은 각각 64.4%와 82.8%로서 비활성화 처리군에 비해 높은 체외성숙율을 나타냈고 이 난자에 ICSI를 통해 수정시켰을 때 상실배와 배반포로의 체외발생율은 34.9%와 6.6%였다고 하였으며, Catt와 Rhodes (1995)는 양, 소, 돼지 난자에 정자 주입전, 후에 외인적으로 활성화시키지 않은채 수정시켰을 때 돼지는 배 발생 및 수정시에 온도에 민감하고, 양은 정자 존재 여부에 관계없이 주입후 활성화되는 경향이 있다고 보고하였다. Keskinetepe과 Brackett (2000)은 ICSI법에 의해 얻어진 소 배반포를 zona-intact, zona-free 군으로 나누어 동결하였을 때 생존율은 87.5% (14/16)와 75.0%(12/16)으로서 높은 생존율(p<0.05)을 나타냈다고 하였다. Martin(2000)은 돼지 난자를 대상으로 ICSI법으로 수정후 48시간에 69%가 생존하였고, 38%가 배반포로 발생하였으며, 1두의 수란돈에 이식하여 3마리의 산자가 출산하였다고 하였다. 그러나 불임개체가 많고 자연수정

이 어려운 소형견의 불임치료를 위해 개 난자에 부고환 정자로 ICSI시 수정과 수정란 생산에 관한 보문은 접할 수 없었다.

이에, 본 연구는 소형견의 불임개체의 해결을 위한 부고환 정자의 이용 가능성을 구명하고자 난소 난포로부터 채취한 난자를 활성화 처리후 부고환 정자로 ICSI에 의해 수정시켰을 때 체외발생율을 조사하기 위하여 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 난포란의 회수와 체외성숙

개 난소를 적출하여, 100 IU/ml의 penicillin G와 100 µg/ml의 streptomycin sulfate를 첨가한 38 °C의 생리식염수에 침지하여 실험실로 옮긴 다음 난소 난포로부터 난포란을 회수하였다. 회수한 난포란은 2 IU/ml의 hCG(Sigma, U.S.A.)와 1 µg/ml의 β-estradiol(Sigma, U.S.A.)과 10%(v/v)의 FCS (Sigma, U.S.A.)가 첨가된 TCM-199(Whittaker, U.S.A.) 또는 synthetic oviductal fluid(SOF, Sigma, U.S.A.) 배양액으로 배양하였다. 난포란의 체외성숙은 배양액 50 µl의 소적을 mineral oil(Squibb, U.S.A.)로 피복된 소적내에 5개의 난포란을 주입하여 CO₂ 배양기내(5% CO₂, 95% air, 38.5°C)에서 24~48시간 성숙배양하였다.

2. 난자의 활성화 처리

난자의 활성화 처리는 난구세포를 제거하기 위하여 0.2% hyaluronidase(Sigma, U.S.A.)가 첨가된 PBS 배지에서 난구세포를 제거하였다. 난구세포가 제거된 난자들중에 제 1극체가 방출된 난자만을 선별하여 7% ethanol에서 5분간 처리 후 2.0 mM dimethylaminopurine(Sigma, U.S.A.)에서 1시간 활성화 처리후 시험에 이용하였다.

3. 정자의 전처리

채취한 신선 또는 부고환 정액을 원심분리하여 정장을 분리한 다음 BO액 2ml에 희석하여 배양기에서 배양하면서 swim-up된 정자를 시험에 이용하거나, 부고환 정액을 채취하여 Kim(2001)의 방법

에 의하여 동결 용해 후 시험에 이용하였다.

4. ICSI

체외성숙 난자의 세포질내 정자의 주입은 micromanipulator(Narishige Co., Japan)가 부착되어 있는 도립현미경 stage위 petri dish내에 사용 전달 전배양한 polyvinylpyrrolidone(Sigma, U.S.A.)액 소적중에 정자를 넣어 운동성을 저하시킨 다음 micropipette에 정자를 장진시켜 보정용 pipette으로 흡인 고정된 체외성숙 난자내에 현미조작에 의해 주입하였다.

5. 체외성숙 및 체외발생율의 판정

난자를 0.2%의 hyaluronidase(Sigma, U.S.A.)를 1~5분간 처리에 의하여 난구세포를 제거하고 나화된 난자는 acetic acid : ethanol(1 : 3)액에 24시간 고정하고 1% aceto-orcein 또는 10 µg/ml bisbenzimidazole(Hoechst 33342, Sigma, U.S.A.) 염색액으로 염색한 다음 세포 및 핵 분열상을 관찰하여 난자의 체외성숙을 판정하였다. ICSI후 초기배를 배양액으로 3회 세척후 10% FCS + TCM-199 배양액으로 배양하면서 현미경하에서 응성전핵 형성과 배의 발생상태를 관찰하거나, FDA(fluorescence diacetate)-test법에 체외발생율과 생존율을 판정하였다(Schilling 등, 1982).

6. 통계학적 분석

반복실험을 통하여 얻어진 결과는 분산분석에 의해 평균치를 구하였으며, 처리간의 차이를 평가하기 위하여 Duncan의 다중검증을 실시하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 소형 개 난자의 체외성숙에 미치는 인자

1) 배양시간

ICSI시 난자의 활성화와 동결 용해한 부고환 정자가 체외성숙에 미치는 영향을 구명하기 위하여 미성숙 난포란을 회수하여 체외성숙 24시간 및 48시간 배양하였을 때 배양시간에 따른 체외성숙율은 Table 1과 같다.

난포란을 회수 후 24시간 배양하였을 때 배양시간에 따른 GV, MI, M II로의 체외발생율은 각각 14/30(46.7%), 2/30(6.7%), 8/30(26.7%)였고 48시간 배양시간에 따른 GV, MI, M II로의 체외발생율은 각각 11/30(36.7%), 3/30(10.0%), 9/30(30.0%)였다. 한편, 퇴화란은 6/30(20.0%)와 7/30(23.3%)였다. 이러한 결과는 개 난자를 이용하여 48시간 배양 후 GVBD 및 M II 기로의 발생율은 각각 33.0%~49.0%와 2.0%~6.0%였다고 한 Hewitt와 England (1999)의 보고에 비하여 약간 높은 체외발달율을 나타냈다. 이는 개 난자를 배양시 양질의 난소 난포와 형태학적 분류를 통해 우수한 난자만을 선별하여 배양한 결과로 판단된다. 개 난자는 성주기, 난포의 발달상태, 난자의 형태 및 개체에 따라 체외발달율에 큰 영향을 미치게 된다고 하였다(Hewitt와 England, 1999; Bolamba 등, 1998).

2) 배양액

미성숙 난포란을 회수하여 SOF와 TCM-199 배양액에서 48시간 배양하였을 때 배양액에 따른 체외발생율은 Table 2와 같다.

난포란을 회수 후 TCM-199과 SOF 배양액에서 48시간 배양하였을 때 배양액에 따른 GV, MI, M II로의 체외발생율은 TCM-199 배양액에서는 각각

Table 1. Meiotic progression of bovine oocytes after 24, 48 hrs of *in vitro* maturation in culture media

Time of culture(hrs)	Oocytes	GV(%)	M I (%)	M II (%)	Degenerated(%)
24	30	14(46.7) ^a	2(6.7)	8(26.7)	6(20.0)
48	30	11(36.7) ^b	3(10.0)	9(30.0)	7(23.3)

* Values with different superscripts within column were significantly different(p<0.05).

Table 2. Meiotic progression of dog oocytes after 48 hrs of *in vitro* maturation in two different culture media

Medium	Oocytes	GV(%)	M I (%)	M II (%)	Degenerated(%)
TCM-199	30	11(36.7)	3(10.0)	7(23.3) ^b	9(30.0)
SOF	30	12(40.0)	4(13.3)	10(30.3) ^a	4(13.3)

* Values with different superscripts within column were significantly different(p<0.05).

11/30(36.7%), 3/30(10.0%), 7/30(23.3%)였고, SOF 배양액에서는 각각 12/30(40.0%), 4/30(13.3%), 10/30(30.3%)였다. 이러한 결과는 개 난자를 이용하여 48시간 SOF + 3% BSA와 SOF + 4% BSA액에서 배양하였을 때 GVBD 및 M II로의 체외성숙율은 각각 20/44(45.0%), 2/33(6.0%)와 15/44(36.0%), 3/42(7.0%)였다고 한 Hewitt와 England(1998)의 보고에 비하여 약간 높은 체외성숙율을 나타냈다. 한편, Karja 등(2001)은 고양이를 대상으로 inactive, follicular, luteal의 3단계의 번식주기로 구분하여 채취후 배양했을 때 GV율은 각각 98.1%, 81.8%, 94.2%로 번식주기에 따라 차이가 있었다고 하였다. 개 난자의 배양시 SOF 배양액에 3%의 BSA를 첨가하여 배양했을 때 다른 배양액에 비해 약간 높은 체외성숙율을 나타냈다고 한다(Hewitt와 England, 1999; Bolamba 등, 1998).

2. 소형 개 난자의 ICSI에 미치는 인자

1) 난자의 활성화

ICSI시 난자의 활성화 처리가 체외발생율에 미치는 영향을 구명하고자 활성화 처리한 난자에 동결 용해한 정자로 ICSI 후 배양하였을 때 배반포로

의 체외발생율은 Table 3과 같다.

활성화 처리를 한 난자에 동결 용해한 부고환 정자로 ICSI후 배양하였을 때 상실배와 배반포로의 체외발생율은 각각 3/16(18.8%), 4/16(25.0%)였고, 활성화 처리를 하지 않은 난자군의 체외발생율은 각각 3/13(23.1%), 1/13(7.7%)에 비해 난자를 활성화 처리를 했을 때 높은 체외발생율을 나타냈다. 이러한 결과는 개 난자의 ICSI에 대한 동일한 연구 보고를 찾을 수 없어 정확하게 비교할 수는 없지만, 활성화 처리한 고양이 난자를 이용하여 ICSI를 하였을 때 배반포로의 체외발생율은 6.6%였다고 한 Bogliolo 등(2001)의 결과에 비하여 약간 높은 체외발생율을 나타냈다.

2) 동결 용해 부고환 정자

ICSI시 동결 용해한 부고환 정자의 이용 가능성을 구명하고자 활성화 처리한 난자에 신선정자, 부고환 정자 및 동결 용해한 부고환 정자로 ICSI후 배양하였을 때 체외발생율은 Table 4와 같다.

활성화 처리를 한 난자에 신선정자, 부고환 정자 및 동결 용해한 부고환 정자로 ICSI후 배양하였을 때 배반포로의 체외발생율은 각각 8/18(44.4%), 5/16(31.3%), 2/14(14.3%)로서 동결 부고환 정자로

Table 3. Cleavage rate of activated or nonactivated oocytes obtained by ICSI treated with frozen-thawed epididymal spermatozoa

Treatment	Oocytes (%)	Cleavaged (%)	Stage of development(%)			
			2~8 cell(%)	8~16 cell(%)	Morula(%)	Blastocyst (%)
ICSI(A)	20	16(80.0)	3(18.8)	6(37.5)	3(18.8)	4(25.0) ^a
ICSI(NA)	20	13(65.0)	5(38.5)	4(30.8)	3(23.1)	1(7.7) ^b

* A : activated oocytes, NA : nonactivated oocytes.

* Values with different superscripts within column were significantly different(p<0.05).

Table 4. Cleavage rate of activated oocytes obtained by ICSI treated with fresh, epididymal sperm and frozen-thawed epididymal spermatozoa

Type of sperm	Oocytes (%)	Cleaved (%)	Stage of development			
			2~8 cell(%)	8~16 cell(%)	Morula(%)	Blastocyst(%)
Fresh	20	18(90.0)	2(11.1)	5(27.8)	3(16.7)	8(44.4) ^a
ES*	20	16(80.0)	6(37.5)	3(18.8)	2(12.5)	5(31.3) ^b
FES**	20	14(70.0)	9(64.3)	2(14.3)	1(7.1)	2(14.3) ^b

* Values with different superscripts within column were significantly different(p<0.05).

* ES : epididymal sperm, ** FES : frozen epididymal sperm.

ICSI시 신선정자군에 비해 낮은 체외발생율을 나타냈지만 ICSI에 이용 가능성이 있음을 확인하였다. 이러한 결과는 동일한 연구보고를 찾을 수 없어 정확하게 비교할 수는 없지만, 신선정자와 동결정자를 이용하여 ICSI를 하였을 때 체외발생율이 56.0%와 42.0%였다고 한 Kim과 Cheong(2001)의 결과에 비하여 낮은 체외발생율을 나타냈다.

IV. 요약

본 연구는 소형견의 불임 해결과 번식효율 증진을 위해 소형견 난소 난포로부터 채취한 난자를 활성화 처리후 부고환 정자로 ICSI시켰을 때 체외발생율을 조사하기 위하여 수행하였다.

1. 난포란을 회수 후 24, 48시간 배양하였을 때 배양시간에 따른 GV, MI, MII로의 체외발생율은 각각 14/30(46.7%), 2/30(6.7%), 8/30(26.7%)였고 48시간 배양 시간에 따른 GV, MI, MII로의 체외발생율은 각각 11/30(36.7%), 3/30(10.0%), 9/30(30.0%)였다.
2. 난포란을 회수 후 48시간 배양하였을 때 배양액에 따른 MII로의 체외발생율은 SOF액(10/30, 30.3%)에서의 배양이 TCM-199액(7/30, 23.3 %)보다 높은 체외발생율을 나타냈다.
3. 활성화 처리 난자에 부고환 정자로 ICSI를 하였을 때 상실배와 배반포로의 체외발생율은 각각 3/16(18.8%), 4/16(25.0%)로서 비활성화 처리 난자군의 3/13(23.1%), 1/13(7.7%)에 비해 높은 체외발생율을 나타냈다.

4. 활성화 처리 난자에 신선정자, 부고환 정자 및 동결 용해한 부고환 정자로 ICSI를 하였을 때 체외발생율은 각각 8/18(44.4%), 5/16(31.3%), 2/14(14.3%)로서 동결 부고환 정자 처리군은 신선정자 처리군에 비해 낮은 체외발생율을 나타냈다.

V. 인용문헌

1. Allen, A. C. and England, G. C. W. 1992. Factors affecting the viability of canine spermatozoa. II. Effects of seminal plasma and blood. *Theriogenology*, 37(2):373-381.
2. Allison, A. C. and Hartree, E. F. 1970. Lysosomal enzymes in the acrosome and their possible role in fertilization. *J. Reprod. Fert.*, 21: 501(Abst.).
3. Bar Hava, I., Ashkenazi, J., Shelef, M., Schwartz, A., Brengauz, M., Feldberg, D., Orvieto, R. and Ben Raael, Z. 1977. Morphology and clinical outcome of embryos after *in vitro* fertilization are superior to those after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.*, 68(4): 653-657.
4. Barros, A., Sousa, M., Oliveira, C., Silva, J., Almeida, V. and Beires, J. 1997. Pregnancy and birth after intracytoplasmic sperm injection with totally immotile sperm recovered from the ejaculate. *Fertil. Steril.*, 67(6):1091-1094.

5. Bogliolo, L., Leoni, G., Ledda, S., Naitana, S., Zedda, M., Carluccio, A. and Pau, S. 2001. Intracytoplasmic sperm injection of *in vitro* matured oocytes of domestic cats with frozen-thawed epididymal spermatozoa. *Theriogenology*, 56:955-967.
 6. Bolamba, D., Borden-Russ, K. D. and Durrant, B. S. 1998. *In vitro* maturation of domestic dog oocytes cultured in advanced preantral and early antral follicles. *Theriogenology*, 49:933-942.
 7. Catt, J. W. and Rhodes, S. L. 1995. Comparative intracytoplasmic sperm injection(ICSI) in human and domestic species. *Reprod. Fertil. Dev.*, 7(2):161-166.
 8. Dott, H. M. and Dingle, J. T. 1968. Distribution of lysosomal enzymes in the spermatozoa and cytoplasmic droplets of bull and ram. *Exp. Cell Res.*, 52:523(Abst.).
 9. Gunzel, A. R. 1986. Semen collection, evaluation, preservation and artificial insemination in the dog. *Tierarzti Prax.*, 14:275-282.
 10. Hewitt, D. A. and England, G. C. W. 1999. Synthetic oviductal fluid and oviductal cell coculture for canine oocytes maturation *in vitro*. *Anim. Reprod. Sci.*, 55(1):63-75.
 11. Holden, C. A., Fuscaldo, G. F., Jackson, P., Cato, A., Southwick, G. J., Hauser, R., Temple Smith, P. D. and McLachlan, R. I. 1977. Frozen-thawed epididymal spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.*, 67(1):81-87.
 12. Hoover, L., Baker, A., Check, J. H., Lurie, D. and Summers, D. 1997. Clinical outcome of cryopreserved human pronuclear stage embryos resulting from intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.*, 67(4):621-624.
 13. Karja, N. W. K., Otoi, T., Murakami, M., Fahrudin, M. and Suzuki, T. 2002. *In vitro* maturation, fertilization and development of domestic cat oocytes recovered form ovaries collected at three stages of the reproductive cycle. *Theriogenology*, 57(9):2289-2298.
 14. Keskintepe, L. and Brackett, B. G. 2000. Cryopreservation of bovine blastocysts obtained by intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology*, 53(5):1041-1052.
 15. Kim, S. K. 2001. Studies on the viability of frozen removed seminal plasma by saline(RSP-S) and tris-buffer(RSP-T) semen of small species dogs. *Korean J. Anim. Reprod.*, 25(3):269-275.
 16. Kim, S. K. and Cheong, J. H. 2001. Effects of individual variance of bull, sperm type and pretreatment of sperm and oocytes on male pronuclear formation and development rates in Korean native cattles. *Korean J. Emb. Trans.*, 16(2):139-144.
 17. Martin, M. J. 2000. Development of *in vivo*-matured porcine oocytes following intracytoplasmic sperm injection. *Biol. Reprod.*, 63(1):109-112.
 18. Schilling, E., Niemann, H. and Schmidt, D. 1982. Evaluation of fresh and frozen cattle embryos by fluorescence microscopy. *Cryobiology*, 15:245-248.
- (접수일자: 2002. 3. 25. / 채택일자: 2002. 4. 20.)